

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU**

Iva Kovačević, apsolvant

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**Utjecaj regulatora rasta na klijavost damaščanske crnjike (*Nigella  
damascena* L.)**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Iva Kovačević, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**Utjecaj regulatora rasta na klijavost damaščanske crnjike (*Nigella  
damascena* L.)**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković, predsjednik
2. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, član

Osijek, 2019.

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Nigella spp.</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Damaščanska crnjika (<i>Nigella damascena</i> L.).....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Klasifikacija.....	3
1.2.2. Morfologija.....	3
1.2.3. Uzgoj.....	5
<b>1.3. Cilj istraživanja.....</b>	<b>5</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>6</b>
2.1. <i>In vitro</i> uzgoj.....	6
2.2. Uzgoj na filter papiru .....	9
2.3. Utjecaj različitih hormona .....	11
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1. Biljni materijal .....	13
3.2. Uzgoj na filter papiru .....	13
3.3. <i>In vitro</i> uzgoj.....	15
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damaščanske crnjike na filter papiru .....	18
4.2. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damaščanske crnjike <i>in vitro</i> .....	20
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
5.1. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damaščanske crnjike na filter papiru .....	24
5.2. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damaščanske crnjike <i>in vitro</i> .....	26
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>28</b>
<b>7. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>29</b>

<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>34</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>35</b>
<b>10. POPIS TABLICA .....</b>	<b>36</b>
<b>11. POPIS SLIKA .....</b>	<b>37</b>
<b>12. POPIS GRAFIKONA .....</b>	<b>38</b>
Temeljna dokumentacijska kartica .....	39
Basic documentation card.....	40

## 1. UVOD

### 1.1. *Nigella* spp.

Rod *Nigella* L. dobio je ime po svojim sjemenkama koje su karakteristične i crne u većini vrsta *Nigella*. Latinski pojam *nigellus* umanjenica je riječi *niger*, što znači „crni“ (Hegi, 1975.). Biljke roda *Nigella* jednogodišnje su zeljaste biljka iz porodice žabnjaka (*Ranunculaceae*). Rasprostranjene su u Euroaziji, Sjevernoj Africi, Sredozemlju i Bliskom istoku (Zohary, 1983.).

Prema Heissu i Oegglu (2005.) vrste ovog roda su morfološki karakteristične po:

- Neparno perastim složenim listovima čiji su segmenti više ili manje linearne nervature
- Cvijet je dvospolan, pentameran i tetraciklički, s bijelim, plavim ili žutim lapovima koji traju do zrenja ploda
- Medonosnim laticama koje su smanjene veličine i karakterističnog su oblika; svaka latica se sastoji od donjih latica (rascijepane usne), koje izlučuju nektar i gornjih latica (gornje usne), koje služe kao poklopac
- Plod tobolca zajedno tvore pet plodnih listića (Zohary, 1983.)
- Ovojnici od fino narezanih listića oko cvata
- Sjeme većine vrsta iz roda je crno i sitno

Prema Zohary (1983.) rod *Nigella* se dijeli na odjeljke ovisno o obliku i načinu otvaranja ploda:

- I. odjeljak *Komaroffia*
- II. odjeljak *Gardiella*
- III. odjeljak *Nigella*

Vrste iz odjeljka *Komaroffia* i *Gardiella* imaju napuhane kapsularne plodove, odnosno tobolce koji se otvara duž trbušnog i leđnog šava, dok kod odjeljka *Nigella* samo neke vrste imaju napuhan kapsularni plod koji je djelomično otvoren (primjer *Nigella damascena*).

Odjeljak *Nigella* podijeljen je na tri pododjeljka unutar kojeg se nalaze najpoznatije ukrasne i ljekovite vrste, a to su *Nigella damascena* L., *Nigella sativa* L., *Nigella arvensis* L., *Nigella hispanica* L. i *Nigella orientalis* L.

## 1.2. Damaščanska crnjika (*Nigella damascena* L.)

Damaščanska crnjika ili *Nigella damascena* L. nalazi se unutar roda *Nigella*, odjeljka *Nigella* te pododjeljka *Erobathous*. Ime vrste *Nigella damascena* nazvan je po sirijskom glavnom gradu Damasku, koji se odnosi na podrijetlo istočnog Mediterana. Uobičajeni naziv *Nigella damascene* aludira ili na ovaj geografski kontekst, na uporabu biljke kao začina ili na njegovu morfologiju. Potječe iz istočnog Mediterana, izvorno iz Turske, Sirije i Kretske regije (Heiss i Oeggl, 2005.).



Slika 1. Damaščanska crnjika (*Nigella damascena* L.) Izvor: Internet

([https://www.google.com/search?q=Dama%C5%A1%C4%87anske+crnjike+\(Nigella+damascena\)&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjy\\_N-Ul-fiAhVKAxAIHf-XCzsQ\\_AUIECgB&biw=659&bih=640#imgdii=3OCXguNFBKutjM:&imgsrc=9w\\_PqKzPYq\\_3xM:](https://www.google.com/search?q=Dama%C5%A1%C4%87anske+crnjike+(Nigella+damascena)&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjy_N-Ul-fiAhVKAxAIHf-XCzsQ_AUIECgB&biw=659&bih=640#imgdii=3OCXguNFBKutjM:&imgsrc=9w_PqKzPYq_3xM:) )

Kako su kroz povijest ljudi naseljavali nove prostore širile su se i biljne vrste. Kod Tirola u centralnom dijelu Alpa u deponiju rudnika bakra u Schwazu nađeno je djelomično karbonizirano sjeme crnjike iz razdoblja brončanog doba. Ovaj arheološki nalaz je najstariji nalaz o prisutnosti ove vrste u centralnom dijelu Europe (Heiss i Oeggl, 2005.).

Damaščansku crnjiku također još nazivaju mačkov brk, čupava kata, djevojka u plavom, djevojka u zelenom, ljubav u magli, neravna žena i đavo u šumi.

### 1.2.1. Klasifikacija

Tablica 1. Klasifikacija damaščanske crnjike (*Nigella damascena* L.)

<b>CARSTVO</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>PODCARSTVO</b>	<i>Cormobionta</i>
<b>ODJELJAK</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>PODODJELJAK</b>	<i>Magnoliophytina</i>
<b>RAZRED</b>	<i>Magnoliatae</i>
<b>PODRAZRED</b>	<i>Magnoliidae</i>
<b>RED</b>	<i>Ranunculales</i>
<b>PORODICA</b>	<i>Ranunculaceae</i>
<b>ROD</b>	<i>Nigella</i>
<b>VRSTA</b>	<i>Nigella damascena</i> L.

### 1.2.2. Morfologija

Damaščanska crnjika jednogodišnja je vrsta, kratke vegetacije (Brickell, 2006.). Stabljika je uspravna, razgranata. Visinom može biti od 20 do 50 cm. Listovi su joj neparno perasti i razdijeljeni na uske linearne isperke. Ovojni listovi koji se nalaze ispred terminalnog cvijeta slični su listovima stabljike, a tvore ovojnicu od fino narezanog lišća oko cvijeta. Zbog ovojnih listova je i dobila naziv „đavo u šumi“ (Heiss i Oeggl, 2005.). Cvjetovi su dvospolni, organa spiralnih oblika. Izraženi lapovi su jajolikog oblika (Kökdil i sur., 2006.). Latice su smanjene veličine karakterističnog oblika za rad, sadrže nektar te se zbog toga i nazivaju medonosne latice (Zohary, 1983.). Tučak je građen od jednog ili više plodonosnih listova ujedinjenih na vrhu te formiraju glatke napuhane kapsule malo duže od vrata tučka (Kökdil i sur., 2006.). Kod ove vrste prisutan je cvjetni dimorfizam. Razlikujemo divlji i jednostavni tip cvijeta. Cvijet se sastoji od pet obojenih lapova i pet do deset latica karakterističnog oblika, niza prašnika (25 najčešće) i tri do pet oplodnih listića koji tvore tučak (Derooin i sur., 2015.). Dupli cvijet karakterizira odsutnost latica, veći broj lapova i prisutnost cvjetnih organa sličnih lapovima smještenim između čaške i prašnika (Goncalves, 2013.), dok su u zrelijem stadiju morfološki sličniji lapovima. Iako kod Damaščanske crnjike oprašivači posjećuju cvjetove, samooprašivanje je prisutno u najvećem postotku. U najranijem stadiju

cvatnje prašničke niti su uspravne i stoje usko uz tučak, nakon čega se okreću prema van. Vrat tučka se longitudinalno zakreće dok ne dođe u kontakt s prašničkim nitima što rezultira samooplodnjom (Horvat, 2017.).



Slika 2. Cvijet damaščanske crnjike (*Nigella damascene* L.) Izvor: Internet  
([https://blog.dnevnik.hr/nelinagustirna/2013/05/index.html#gallery\[1369582727\]/0/](https://blog.dnevnik.hr/nelinagustirna/2013/05/index.html#gallery[1369582727]/0/) )

Plod *Nigella damascene* L. je tobolac koji se sastoji od pet oplodnih listića spojene strukture (Zohary, 1983.). U početku tobolac je zelene boje, a zrenjem poprima zeleno smeđu boju s istaknutim ljubičasto crvenim pravilnim prugama. Zrenjem tobolci pucaju. Pucanjem tobolaca dolazi do rasipanja sjemena i širenja biljke (Horvat, 2017.).



Slika 3. Tobolac damaščanske crnjike (*Nigella damascene* L.) Izvor: Internet  
([https://blog.dnevnik.hr/nelinagustirna/2013/05/index.html#gallery\[1369582727\]/0/](https://blog.dnevnik.hr/nelinagustirna/2013/05/index.html#gallery[1369582727]/0/) )

Sjeme je trokutasto do jajoliko ili oblika kriške naranče s nekoliko uzdužnih brazda. Boja sjemena je tamnosmeđa do crna, duljinom 2,27 mm, a širine 1,4 mm (Heiss i sur., 2011.).



### 1.2.3. Uzgoj

Sjeme se sije u proljeće direktno na željeno sunčano mjesto jer slabo podnosi presađivanje. Važno je da zemlja bude drenirana i vlažna. Sjeme se može sijati već u jesen, nakon čega prezimi (<https://www.plantea.com.hr/damascanska-crnjika/> ).

### 1.3. Cilj istraživanja

Ispitati utjecaj različitih koncentracija regulatora rasta na klijavost damaščanske crnjike (*Nigella damascena* L.) na filter papiru i *in vitro* hranjivoj podlozi.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *In vitro* uzgoj

Mikropropagacija je alternativni način razmnožavanja koji se može primijeniti u masovnom umnožavanju biljaka u relativno kratkom vremenskom roku. Nedavno su razvijene nove moderne tehnike razmnožavanja s kojim bi se mogla olakšati proizvodnja biljaka u velikoj mjeri i poboljšanje vrsta pomoću tehnika genetskog istraživanja. Mikropropagacija je tehnika uzgoja kulture biljnog tkiva. Ova tehnika se koristi za proizvodnju biljaka i podrazumijeva kulturu „čistih“ malih dijelova tkiva i organa u laboratorijskom posuđu kao što su tikvice, epruvete, staklenke i petrijeve zdjelice. Biljke se uzgajaju na različitom mediju pod strogo kontroliranim i sterilnim uvjetima. Mikropropagacija je postala važna tehnika uzgoja kako za znanost tako i za trgovinu. Iako je tehnika mikropropagacije skuplja ima puno više prednosti u odnosu na konvencionalno vegetativno razmnožavanje. Najbitnija prednosti je razmnožavanje velikog broja biljaka bez patogena ravnomjerno u kratkom vremenskom roku (Kumar i Reddy, 2011.). Biljna mikropropagacija integrirani je proces u kojem su stanice, tkiva i organi odabrane biljke steriliziraju i inkubiraju u aseptičnom okruženju koje potiče rast i proizvodi veliki broj biljaka (Altman, 2000.).

Prema Kumar i Reddy (2011.) postoje različiti faktori koji utječu na *in vitro* uzgoj, a to su medij, vrsta eksplantata, genotip, podrijetlo eksplantata, orijentacija eksplantata, mineralna ishrana, izvor ugljika i agregatno stanje medija.

Proces mikropropagacije prema Zobayed i sur. (2000.), te Loberantu i Altmanu (2010.) može se podijeliti na pet faza:

Faza 0: Izvor eksplantata i matične biljke

Uspjeh mikropropagacije uvelike ovisi o kvaliteti matične biljke. Unatoč tome, jedan od najčešćih problema s kojim se susrećemo kod kulture tkiva je neprecizni pregled stanja biljke iz koje je uzet eksplantat. Učinkovitim odabirom i održavanjem izvornih biljaka trebamo osigurati da biljka ima sljedeće karakteristike:

- certificirani, hortikulturni predstavnik željene vrste i kultivara
- bez bolesti i endogene kontaminacije, ako postoji sumnja na kontaminaciju treba ju odstraniti koristeći specifične tehnike
- izdržljiva i snažna

Matične biljke mogu se održavati u staklenicima u kontroliranim uvjetima, plastenicima ili tunelima, na dobro obilježenim zemljišnim parcelama ili u šumama. Kako bi se osiguralo dovoljno eksplantata dobre kakvoće za komercijalno razmnožavanje, izvor matičnih biljaka mora se identificirati ili kultivirati i kontinuirano održavati, štititi i obnavljati.

#### Faza 1: Uvođenje eksplantata u kulturi

Ova faza se sastoji od uvođenja biljaka. Svrha ove faze je iniciranje sterilnih kultura, a ona uključuje odabir eksplantata, dezinfekciju i uzgoj u sterilnim uvjetima.

Nakon uzimanja biljnih dijelova ili tkiva majčinske biljke i površinske sterilizacije, slijedi uvođenje eksplantata u kulturu što rezultira aktivacijom i množenjem tkiva. Početni eksplantat može biti u rasponu veličine od 0,1 mm do 1 cm. Ova faza traje od jednog tjedna do par mjeseci. Ova faza se izvodi na mediju na bazi agara, ali se mogu koristiti i tekući mediji. Izbor bazalnih medija i regulatora rasta u ovoj fazi je od kritične važnosti i ovisi o tipu biljke i tkiva te željenoj metodi množenja. Uz kontinuirano vizualno praćenje, ova faza služi kao osnovna linija za provjeravanje mikrobiološke kontaminacije.

#### Faza 2: Brzo umnožavanje

Treća faza je faza brze regeneracije i umnažanja. Tkiva se u više navrata presađuju u aseptičkim uvjetima na nove medije koji potiču umnožavanje stanica (proliferaciju). Kultura može dati izdanke za sljedeće faze propagacije, ali također može dati i materijale potrebne za održavanje zaliha.

Primarni eksplantati koji su uspješno prošli fazu I preneseni su aseptično na fazu II za generiranje brojnih klonova propagacije. Masa tkiva se u više navrata prenosi subkultivacijom na nove medije koji potiču proliferaciju. Vrsta regeneracije i proliferacije uvelike ovisi o kombinacijama regulatora rasta. Visoki udio citokina stimulira kontinuirano umnožavanje aksilarnih ili adventivnih izbojaka, a veći udio auksina potreban je za proliferaciju kalusa s generacijom somatske embriogeneze. Kombinirana i uravnotežena prilagodba regulatora rasta, sastav bazalnih medija i uvjeti okoline optimizirani su kako bi se postigla maksimalna proliferacija visoko kvalitetnih novih biljnih propagula. Trajanje ove faze je neograničeno, ali obično traje nekoliko mjeseci. U odabranoj krajnjoj točki obično nakon ograničenog broja supkultura, zalihe kultura se obnavljaju kako bi se spriječile moguće mutacije te gubitak vigora i regeneracije koje su povezane s endogenom kontaminacijom ili učincima dugotrajnog tretiranja s regulatorima rasta.

Dostupna je široka raznolikost izvođenja faze II, to jest adventivnih i aksijalnih izbojaka i somatske embriogeneze na mediju baziranom na agaru. Tekuća kultura za proizvodnju biomase ili sekundarnih spojeva zahtijevaju strategije proizvodnje i protokole koji su prilagođeni za svaku biljku i tehnologiju.

#### Faza 3: *In vitro* postavljanje biljke, izduživanje i ukorjenjivanje

Faza produljenja i indukcije ili razvoja korijena, odnosno faza ukorjenjivanja osmišljena je kako bi potakla uspostavu potpuno razvijenih biljaka. Ova faza je posljednje razdoblje *in vitro* prije prijenosa biljaka u uvjete *ex vitro* gdje se biljke navikavaju na vanjske uvjete.

Nakon ponovljenih supkultura i provjera na mikrobnu kontaminaciju, dobivene biljčice se prenose u zadnju *in vitro* fazu. Faza III je namijenjena za zaustavljanje razmnožavanja i poticanje uspostavljanja potpuno razvijene biljke, odnosno izduživanje izdanaka, stvaranje korijena i ako je potrebno formiranje skladišnih organa koji služe kao neovisne jedinice za razmnožavanje (lukovice, gomolji). Ova faza može osigurati uvjete za stimulaciju fotosinteze i druge fiziološke promjene koje su potrebne za uspostavljanje autotrofnog rasta u fazi aklimatizacije *ex vitro*. To se postiže modifikacijama kulture i okoliša kao što su smanjenje koncentracije citokinina ili njihova ukupna eliminacija, dodavanje ili povećanje auksina i/ili smanjenje razine šećera, a često i povećanog intenziteta svjetla. Nastajanje korijena je podijeljeno u faze indukcije, stanične aktivacije, orijentacije, organizacije i pojave pravog korijena koji je najizravnije povezan sa sposobnosti ukorjenjivanja mladice ili reznica. Za poboljšanje učinkovitosti ove faze i smanjenje troškova proizvodnje, predloženi su sustavi koji skraćuju proces i omogućavaju da se veći dio njih odvija *ex vitro* ili u manje sterilnom *in vitro* okruženju (Altman i Loberant, 1998.).

#### Faza 4: Aklimatizacija

Prelazak u *ex vitro* stanje ili aklimatizacija. Proces aklimatizacije se definira kao klimatska ili ekološka prilagodba organizma, posebno biljke koja je premještena u novo okruženje. Aklimatizacija *in vitro* kultura podvrgava biljke poremećenim i stresnim uvjetima okoline i prehrani. Aklimatizacija na ove uvjete dovodi do stvaranja biljaka koje se morfologijom, anatomijom i fiziologijom razlikuju od prirodno uzgojenih biljaka, uključujući reducirane naslage voska, nefunkcionalne puči, aberantnu fotosintetsku aktivnost, smanjeni razvoj korijenove konstrukcije i tako dalje.

Nakon prelaska iz *in vitro* u *ex vitro* fazu potrebna je aklimatizacija kako bi se ispravile abnormalnosti i kako bi se osigurao pravilan rast i preživljavanje biljaka. U početku se biljke stavljaju pod slabo osvjetljenje, a temperatura i vlažnost su slične uvjetima *in vitro* u inkubatoru za *ex vitro* biljke. Razvijaju se kutikularni voskovi, puči i novi funkcionalni korjenčići, povećava se fotosintetska aktivnost, a biljke postaju autotrofne. Tijekom sljedećih tjedana postupno se povećava intenzitet svjetlosti, a temperatura i vlažnost reguliraju se prema uvjetima u stakleniku. Za dodatno poticanje razvoja korijena mogu se koristiti hormoni, a antimikrobna sredstva se mogu primijeniti za suzbijanje nastanka bolesti.

Većina laboratorija i rasadnika presađuje biljke u homogeni medij koji adekvatno podupire biljku, ima prikladan pH, dobro je pufiran, povoljan i dovoljno porozan da omogući adekvatnu drenažu i ozračivanje (Debergh i Zimmerman, 1990.). *In vitro* biljke koje se ne mogu prilagoditi ovoj fazi smatraju se neuspješnima (Altman i Loberant, 1998.).

Kolb i sur. (2019.) istraživali su *Nigella damascenu* kao objekt biotehnološkog istraživanja. Jedan od biotehnoloških pravaca je *in vitro* kultura, a istraživali su mogućnosti uvođenja *Nigella damascene* u kulturu *in vitro*. Korištena je Murashige i Skoog (MS) hranjiva podloga uz regulatore rasta u količini od 2 i 3 mg/L IAA, 0,1, 0,5 i 1 mg/L NAA i 0,5 mg/L kinetina. Najbolje rezultate dobili su s modificiranim medijem od 3 mg/L IAA, 1 mg/L NAA i 0,5 mg/L kinetina. Nakon 60 dana dobivena je kulusu slična biomasa *Nigella damascene*.

Al-Ani (2008.) je u svom istraživanju koristio korijen, hipokotile i listove *Nigella sativa* L. prikupljene iz sadnica uzgojenih metodom filter papir i uzgajao ih metodom *in vitro* na MS hranjivoj podlozi s različitim koncentracijama 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 mg / l) i Kn (0, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5). Najbolju produkciju kalusa imale su biljke uzgojene na koncentracijama 1 mg/L 2,4-D i 1,5 mg/L Kn.

## **2.2. Uzgoj na filter papiru**

U svojem istraživanju Horvat (2012.) uspoređivala je klijavost različitih cvjetnih vrsta. Cilj istraživanja bio je ispitati klijavost sjemena cvjetnih vrsta slučajno odabranih u maloprodajama. Ispitivani uzorak obuhvatio je sve distributere sjemena prisutne na tržištu Hrvatske. Ispitano je 36 pojedinačnih uzoraka različitih cvjetnih vrsta, među kojima su se našle *Ageratum houstonianu* Miller, *Amaranthus caudatus* L., *Amobium alatum* R.Br., *Aubretia deltoidea* DC. A. gracca Griseb, *Callistephus chinensis* (L.) Nees, *Celosia argentea* L., *Centaurea cyanus* L., *Cosmos bipinnatus* Cav., *Dianthus barbatus* L., *Gonphrena globosa* L., *Gypsophila elegans* M.Bieb, *Helichrysum bracteatum* (Vent.) Andrews, *Kochia*

*scoparia* (L.) Schard, *Limonium sinuatum* (L.) Miller, *Nigella damascena* L. i *Primula vulgaris* Hudson. Uzorkovano je 3 do 5 vrećica sjemena. Metodom na filter papiru (NF) u petrijevim zdjelicama ispitana je klijavost svih cvjetnih vrsta. Najmanja klijavost zabilježena je kod vrste *Viola odorata* i *Petunia vulgaris* koje se ubrajaju među najtraženije cvjetna vrste. Rezultati istraživanja pokazali su da ispitivane cvjetne vrste imaju lošu klijavost ili uopće nisu klijave.

Horvat i sur. (2012.) radili su istraživanje s ciljem ispitivanja kvalitete sjemena cvjetnih vrsta koji se koriste u sušenim cvjetnim aranžmanima, dostupnim na hrvatskom tržištu u 2011. godini. Određivanje vigora i klijavosti odrađeni su filter papir metodom. Kvaliteta je ocjenjivana standardnom ISTA metodom ispitivanja sjemena. Proučavano je 12 uzoraka sjemena u odnosu na potencijal vitalnosti i klijavosti, zdravstveno stanje, brzina nicanja u kontejnerima, vrijeme cvatnje, duljina cvatnje, autentičnost certificiranih vrsta, visina biljke, boja cvijeta, dužina, visina i širina, te optimalna faza sušenja. Istraživanje je provedeno s dva uzorka *Amaranthus caudatus*, *Nigella damascene* i *Celosia argentea* var. *cristata*, četiri uzorka *Helichrysum bracteatum* i *Limonium sinuatum*, jedan uzorak *Celosia argentea* var. *plumosa*, *Ammobium alatum* i *Gomphrena globosa*, te dva uzorka certificirana kao suho cvijeće mješovitih vrsta. Najsiromašnija značajka svih ispitivanih sjemenki bilo je klijanje u rasponu od 0 do 94 %. Najčešća prisutna gljivica bila je *alternaria*. Sve vrste su ispravno certificirane, osim jednog uzorka *Celosia argentea* var. *cristata* i *Celosia argentea* var. *plumosa*. Istraživanje sugerira kako bi se na hrvatsko tržište trebalo opskrbljivati sjemenkama veće kvalitete.

Pavlović (2016.) uspoređivala je utjecaje različitog osvjetljenja na klijavost damašćanske crnjike i različita metodom uzgoja na filter papiru. Rezultati istraživanja pokazali su da osvjetljenje nije imalo značajnog utjecaja na energiju klijanja, ali je imalo utjecaj na klijavosti kod obje cvjetne vrste. Bolja energija klijanja i klijavosti postignuta je na bijelom svjetlu kod obje cvjetne vrste. Različito osvjetljenje kod damašćanske crnjike nije imalo značajan utjecaj na masu klijanaca, dok je kod dužine korijena i stabljike uočena veća razlika. Promjene u masi klijanaca, dužini korijena i stabljike su uočene pri različitom utjecaju svjetla kod razlika. Na bijelo svjetlu je zabilježena veća masa klijanaca, duži korijen i duža stabljika u obje cvjetne vrste.

Tkalec i sur. (2017.) radili su istraživanje o kvaliteti jednogodišnjih cvjetnih vrsta pod utjecajem LED svjetla. Cilj istraživanja je bio ispitati klijavost i morfološke značajke nekih

jednogodišnji cvjetnih vrsta pod utjecajem različitih svjetlosnih uvjeta. Ispitivano je sjeme cvjetnih vrsta: *Patula* L., *Calendula officinalis* L., *Nigella damascena* L., *Centaurea cyanus* L., *Petunia* Juss. i *Impatiens walleriana* L. Pokus je postavljen u tri ponavljanja za svaki tretman svjetlom i svaku cvjetnu vrstu u petrijeve zdjelice metodom na filter papiru. Petrijeve zdjelice sa sjemenom stavljene su u komoru za uzgoj pod umjetnim bijelim i plavim svjetlom pod 12 hL / 12 hD. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku u energiji klijanja, dok su klijavost *Nigella damascena* L. i *Centaurea cyanus* L. bile znatno niže na LED svjetlu. Hipokotile svih istraživanih sadnica bile su značajno duže na FLUO svjetlu. Kod *Tagetes patula* L. zabilježen je značajno duži korijen na LED svjetlu, dok su ostale imale znatno duži korijen na FLUO svjetlu. Na FLUO svjetlu kod vrsta *Centaurea cyanus* L., *Petunia* Juss. i *Impatiens walleriana* L. zabilježena je značajno veća masa.

### 2.3. Utjecaj različitih hormona

Raman i Greyson (1978.) radili su istraživanje vezano za diferencijalnu osjetljivost na regulatore rasta biljaka kultiviranim „jednim“ i „dvojnim“ cvjetnim pupoljkom *Nigella damascene* L. Utvrdili su da se „dvostrukost“ ponaša kao karakter jednog gena, recesivno u odnosu na normalnu divlju „pojedinu“ formu. Otkrili su brojne diferencijalne odgovore kultiviranih cvjetnih vršaka dvaju oblika na regulatore rasta. „Pojedinačni“ pupoljci inicirali su sve tipove organa na definiranom mediju bez bilo kakvih regulatora rasta. „Dvostruki“ pupoljci zahtijevali su ili kinetin ili GA3 za razvoj normalnog komplementarnog organa. Kinetin je poboljšao rast i razvoj pupoljaka oba genotipa, dok je GA3 u svim koncentracijama specifično inhibirao inicijaciju i rast prašnika i pojavu nektara u „pojedinačnim“ pupoljcima. Nijedna kombinacija IAA ili kinetina nije prevladala ovu inhibiciju „pojedinačnih“ pupova s GA3. U prisustvu IAA i GA3 „jednostruki“ pupoljci nakon inicijacije normalnih tučaka, inicirali su nekoliko abnormalnih struktura tučaka iz područja koja nisu uspjela proizvesti prašnike i nektar.

Rudnicki i Kaukovirta (1991.) su proveli istraživanje vezano za sekvencijske tretmane koji se sastoje od ispitivanja temperaturnog raspona, upijanja vode, primjene giberelinske kiseline (GA), monokromatska crvena svjetlost i stupnjevanje sjemena prema veličini kako bi se odredili optimalni uvjeti za oslobađanje dormantnosti i ujednačene klijavost sjemenki *Nigella damascene* L. Rezultat ovog istraživanja pokazao je da GA i crveno svjetlo na 660 nm stimuliraju klijanje sjemena i naknadno preživljavanje sadnica. Najbolji kapacitet

klijanja zabilježen je kod najvećih sjemenki, posebno onih tretiranih s GA, ali 20 do 30 % sjemenki nije proklijalo.

El-Ghamery i Mousa (2017.) ispitivali su učinak različitih tretmana benziladeninom (BA) na citologiju i rast *Nigella sativa* L. i *Allium cepa* L. metodom na filter papiru. Koristili su šest koncentracija BA u rasponu od 5 do 55 ppm primijenjeno za 6, 12, 18, 24, 36 i 48 h. Zaključili su da BA uzrokuje toksični učinak na stanice u vrhovima korijena *Nigella sativa* L. i *Allium cepa* L.

Rouhi i sur. (2012.) ispitivali su mogućnosti prekida dormantnosti sjemena *Nigella sativa* L. Cilj istraživanja bio je ispitati pucanje sjemena crnog kima. Prikupljene sjemenke podvrgnute su različitim tretmanima metodom na filter papiru: koncentriranom sumpornom kiselinom 30 i 60 sekundi, vrućom vodom na 70 i 80°C tijekom 5 i 10 minuta, koncentracijama giberelinske kiseline za 250, 500, 750, 1000 i 1250 ppm tijekom 24 sata, tri razine KNO<sub>3</sub> (0,1, 0,2 i 0,3 % v/v) i 3 različita stratifikacijska razdoblja. Najbolji postotak klijanja, prosječno vrijeme klijanja, dužina klijanaca, suha masa sadnica i indeks vitalnosti zabilježeni su kod stratifikacije koja je trajala tri tjedna. Sve osobine klijanja crnog kima povećale su se pri svim koncentracijama GA<sub>3</sub>, ali je najbolji rezultat ostignut pri koncentraciji od 1250 ppm. Tretman KNO<sub>3</sub> imao je pozitivan učinak na klijavost sjemena u svim razinama.

Mawahib i sur. (2015.) ispitivali su ekstrakte sjemenki *Nigella sativa* i njezin inducirani kalus za antimikrobno djelovanje protiv četiri standardne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) i dvije gljive (*Candida albicans* i *Aspergillus niger*) primjenom metode difuzije agara. Kako bi inducirali kalus, hipokotil i kotiledon iz *Nigella sativa* uzgajali su ih metodom *in vitro* na MS mediju dopunjenom različitim vrstama i različitim koncentracijama regulatora rasta. Eksplantati crnog kima uzgojeni na MS mediju dopunjenom s 1,0 mg/L i 5,0 mg/L NAA pokazali su brzu indukciju kalusa nakon dva tjedna, dok je spora indukcija kalusa uočena kada su hipokotili uzgojeni na MS mediju obogaćeni s 5 mg/ 1,4-D i 0,5 mg/ 1,4-D, gdje su eksplantati bili kotiledoni. U ovom istraživanju zaključeno je da je NAA prikladan hormon rasta za *Nigella sativa* za obje korištene vrste eksplantata. Metanolni ekstrakti sjemena i kalus crnog kima pokazali su aktivnost protiv *Escherichia coli* sa zonom inhibicije 21 mm i 23 mm. Antifungalna aktivnost nije opažena ni za sjeme ni za kalus.



### 3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno akademske godine 2018./2019. u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito i začinsko bilje, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

#### 3.1. Biljni materijal

Kao materijal u laboratorijskom ispitivanju korišteno je netretirano sjeme cvjetne vrste damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.). Sjeme damašćanske crnjike kupljeno je u Hrvatskoj, u trgovačkom centru Lidl.



Slika 4. Sjeme damašćanske crnjike (foto original: I. Kovačević)

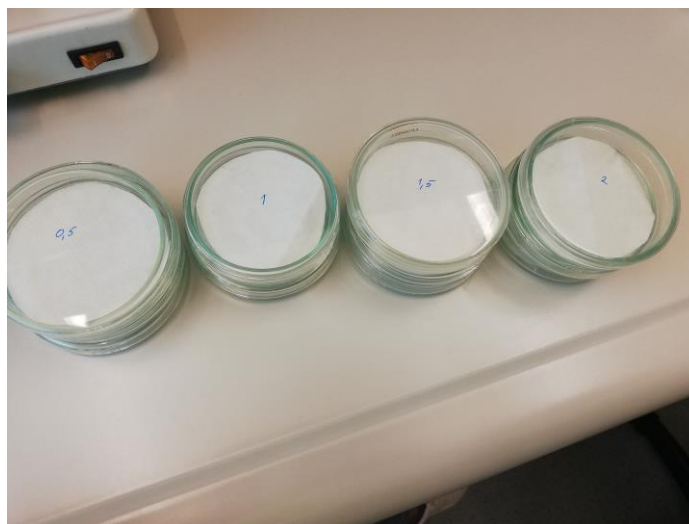
#### 3.2. Uzgoj na filter papiru

Kod postupka uzgoja na filter papiru korišten je sljedeći pribor za ispitivanje:

- škare
- filter papir
- 15 petrijevih zdjelica
- otopina različitih koncentracija citokinina (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L)
- 96 % alkohol
- destilirana voda
- pinceta
- boca štrcaljka 100 ml

- flomaster
- klima komora

Za postavljanje pokusa bilo je potrebno pripremiti 15 petrijevih zdjelica. Zdjelice su sterilizirane s 96 % etanolom. Nakon sterilizacije u petrijeve zdjelice je stavljen izrezani filter papri prilagođen obliku zdjelice. Ukupno 300 sjemenki damaščanske crnjike ručno je prebrojano i podijeljeno u 5 grupa po 60 sjemenki.



Slika 5. Petrijeve zdjelice (foto original: I. Kovačević)

Tako pripremljeno sjeme damaščanske crnjike natopljeno je u otopine s različitom koncentracijom citokina BAP (6-benzilaminopurin) (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L) u kojoj su stajale 24 h.



Slika 6. Sjemenke natopljene u različitim koncentracijama citokina BAP (foto original: I. Kovačević)

Nakon 24 h sjemenke su stavljene u petrijeve zdjelice zajedno s filter papirom koji je prethodno navlažen destiliranom vodom. Pokus je postavljen u tri ponavljanja za svaku pojedinu koncentraciju. Pokus je postavljen u klima komoru na temperaturu  $23 \pm 1$  °C.

Nakon 14 dana zabilježen je broj proklimalih sjemenki, dužina korijena (cm) te dužina hipokotila (cm).

### **3.3. *In vitro* uzgoj**

Kod postavljanja pokusa korištene su različite grupe laboratorijske opreme:

a) Oprema za pripremu hranjive podloge

Kod postupka pripreme hranjive podloge korišteni su električno kuhalo, rostfrei posuđe, plastična kuhača, destilirana voda, precizna vaga (0,01 g), špatule za vaganje, pH metar, kemikalije, 12 petrijevih zdjelica, teglice, staklene menzure i čaše, pipete, autoklav.

b) Oprema za sterilno rukovanje biljnim materijalom

Za sterilno rukovanje biljnim materijalom korištena je laminarna komora, petrijeve zdjelice, pincete, čaše, 96 % etanol, flomaster.

c) Opća oprema

Kao opću opremu korišteni su hladnjak, kolica, detergentski za posuđe, četke različitih veličina.

d) Klima komora

Hranjiva podloga se sastoji od mikro i makro otopina hranjivih tvari, otopine vitamina i željeza, 3 % saharoze, 0,7 % agara i 100 mg/L inositola. pH vrijednost hranjive podloge se podešava na 5,8 pomoću pH metra prije autoklaviranja. U istraživanju je korištena podloga s različitim koncentracijama regulatora rasta citokinina BAP u količini od 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L te 2 mg/L BAP-a.

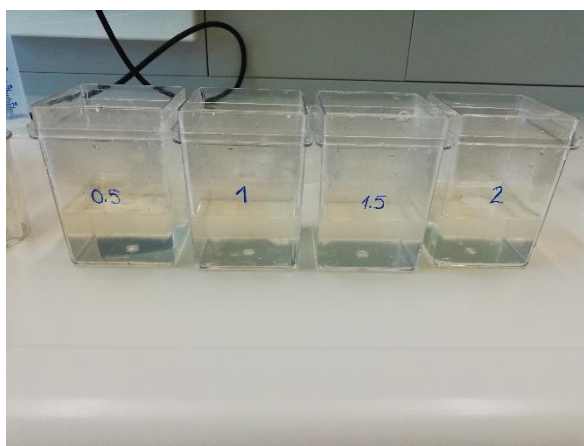
Priprema hranjive podloge:

U lonac se usipa destilirana voda i stavi na zagrijavanje na električno kuhalo. Kada se voda zagrije dodaje se agar i miješa dok voda ne prokuha. Nakon što voda prokuha dodaje se

šećer, odnosno saharoza. Pipetom se dodaje odgovarajuća količina mikroelemenata, makroelemenata, vitamina i željeza, nakon čega se prelije u menzuru i dopuni do određenog volumena, nakon čega se vraća u lonac i podešava joj se pH na 5,8 korištenjem HCl ili NaOH. U smjesu se dodaju hormoni indol-3-maslačna kiselina (IBA) iz grupe auksina, koji se priprema otapanjem u NaOH i 6-benzilaminopurin (BAP) iz grupe citokinina, koji se priprema otapanjem u HCl. U petrijeve zdjelice se izlijeva smjesa, a zatim se stavljaju u autoklav na 15 minuta.

Tablica 2. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge

Sastojak	Količina			
Agar	6,4 g			
Inositol	0,1 g			
Saharoza	30 g			
Makroelementi	100 mL			
Mikroelementi	1 mL			
Vitamini	1 mL			
Željezo	5 mL			
IBA	1 mL			
BAP	0,5 mg/L	1 mg/L	1,5 mg/L	2 mg/L

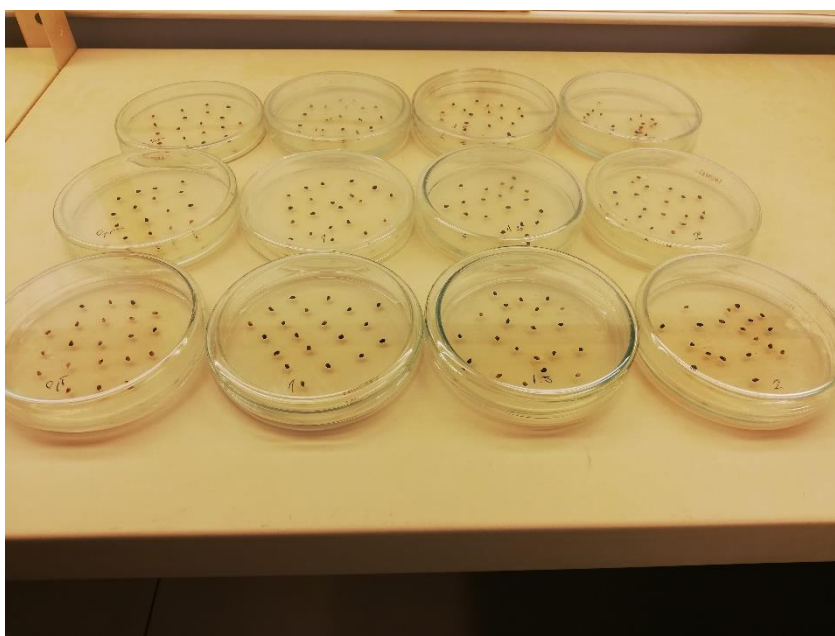


Slika 7. Hranjive podloge s različitom koncentracijom citokinina BAP (foto original: I. Kovačević)

Kod *in vitro* uzgoja svi postupci moraju se obavljati u strogo sterilnim uvjetima te je potrebno površinski sterilizirati sjeme. Sterilizacija je obavljena mućkanjem u teglicama

pomoću 20 % - tne varikine uz dodatak kapljice detergenta u trajanju od 15 do 20 minuta. Nakon mućkanja sjeme damašćanske crnjike ispran je autoklaviranom vodom.

Pribor koji se koristio za uvođenje sjemena prethodno je prokuhan u destiliranoj vodi u trajanju od 30 minuta te stavljen u električni sterilizator u laminar. Uvođenje se obavljalo u laminaru u sterilnim uvjetima pomoću pinceta metodom blagog uranjanja na podlogu. U 12 petrijevih zdjelica uvedeno je 240 sjemenki (20 u svaku). Nakon uvođenja uzorci su stavljeni u klima komoru na temperaturu  $23 \pm 1$  °C.



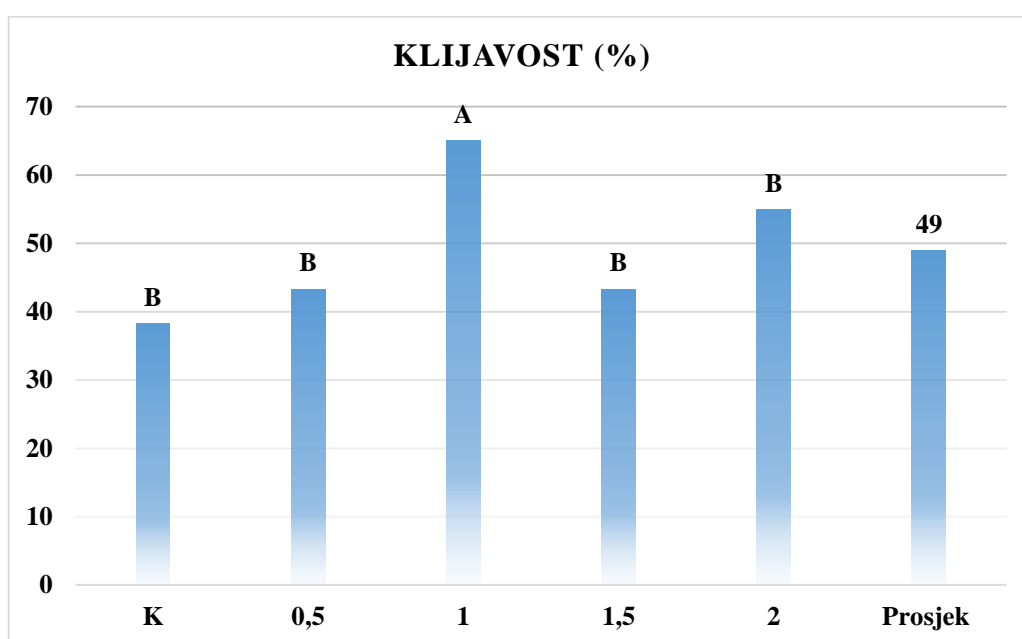
Slika 8. Eksplantati u klima komori (foto original: I. Kovačević)

Nakon 14 dana zabilježen je broj prokljalih sjemenki, dužina korijena (cm), dužina hipokotila (cm), broj vitrificiranih i kontaminiranih klijanaca.

## 4. REZULTATI

Podatci svih ispitivanih svojstava statistički su obrađeni analizom varijance (ANOVA) u programu SAS 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC). Za usporedbu srednjih vrijednosti izračunate su najmanje značajne razlike LSD (engl. *Least Significant Differences*) na razini  $p < 0,05$  u skladu s Fisherovim testom.

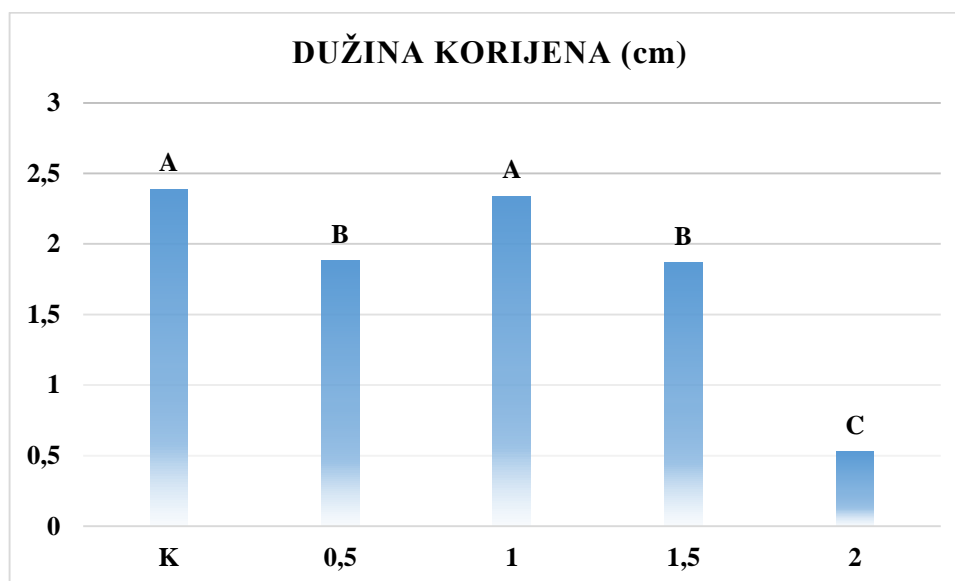
### 4.1. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damašćanske crnjike na filter papiru



K – netretirano sjeme; 0,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 1. Postotak klijavosti damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru

Statističkom obradom podataka ispitivanog parametra klijavosti zabilježene su značajno veće vrijednosti kod tretmana regulatora rasta BAP u koncentraciji 1 mg/L u odnosu na sve ostale tretmane među kojima nije zabilježena značajna razlika. Najveći postotak prokljalih sjemenki 65 % zabilježen je kod tretmana regulatora rasta BAP u koncentraciji 1 mg/L. U kontrolnom tretmanu gdje sjeme nije bilo prethodno tretirano regulatorom rasta BAP zabilježen je najmanji postotak klijavosti i iznosio je 38,33 %. Prosječna klijavost svih tretmana iznosi 49 % (Grafikon 1.).

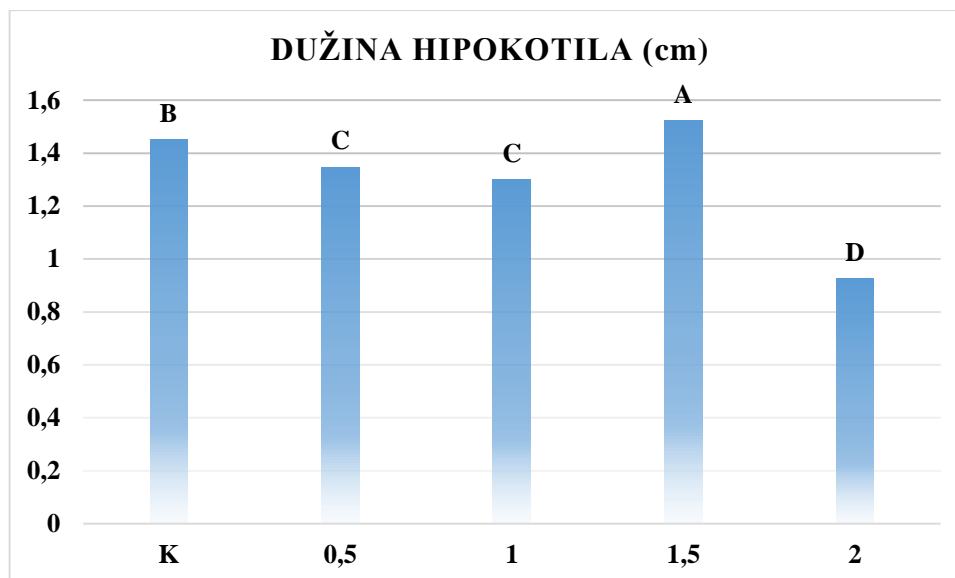


\*K – netretirano sjeme; 0,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 2. Prosječna dužina korijena (cm) damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru

Značajno veće vrijednosti ispitivanog parametara dužine korijena zabilježene su kod tretmana regulatora rasta BAP u koncentraciji 1 mg/L i kontrolnog tretmana u odnosu na sve ostale tretmane. Dobiveni rezultati pokazuju kako su najveće prosječne dužine korijena zabilježene kod kontrolnog tretmana te iznose 2,39 cm, a kod tretmana s 1 mg/L BAP 2,34 cm. Najmanja prosječna dužina korijena 0,53 cm zabilježena je kod tretmana regulatorom rasta BAP u koncentraciji 2 mg/L (Grafikon 2.).

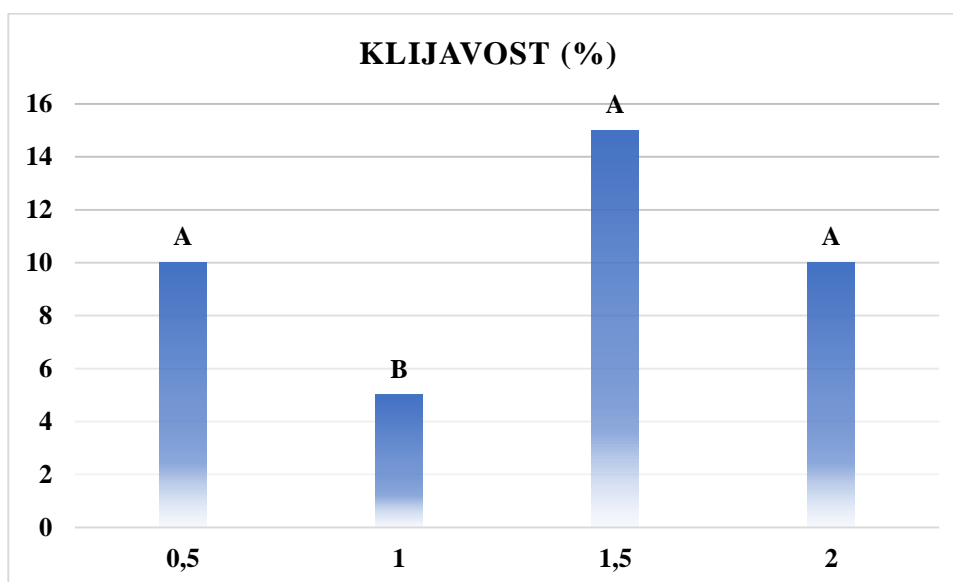
Što se tiče ispitivanog parametra dužine hipokotila značajno veće vrijednosti u odnosu na sve ostale tretmane zabilježene su kod tretmana regulatorom rasta BAP u koncentraciji 1,5 mg/L. Najveća prosječna dužina hipokotila iznosila je 1,52 cm. Najmanja prosječna dužina hipokotila od 0,92 cm zabilježena je na tretmanu regulatorom rasta BAP u koncentraciji 2 mg/L (Grafikon 3.).



\*K – netretirano sjeme; 0,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 3. Prosječna dužina hipokotila (cm) damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru

#### 4.2. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damašćanske crnjike *in vitro*

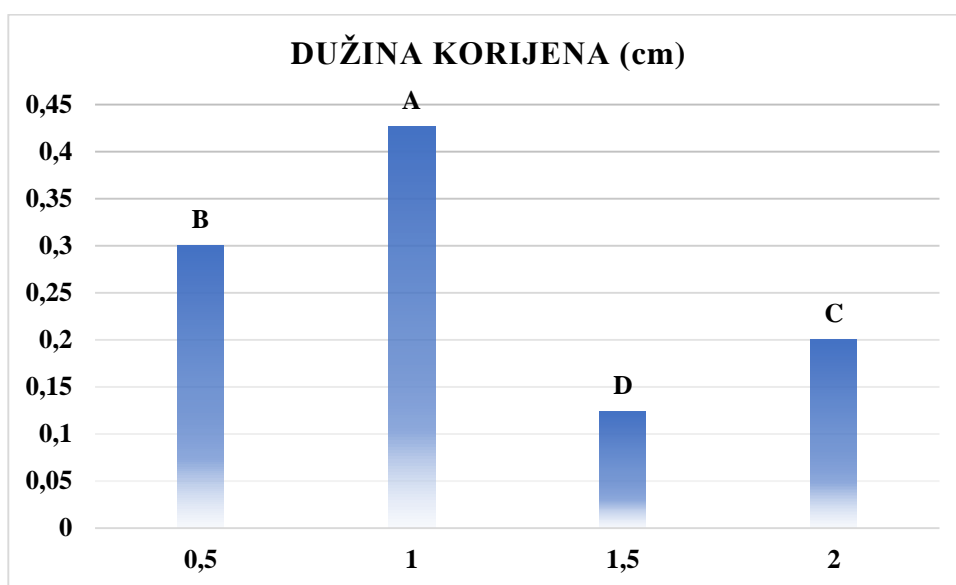


\*0,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 4. Postotak klijavosti (%) damašćanske crnjike kod *in vitro* uzgoja



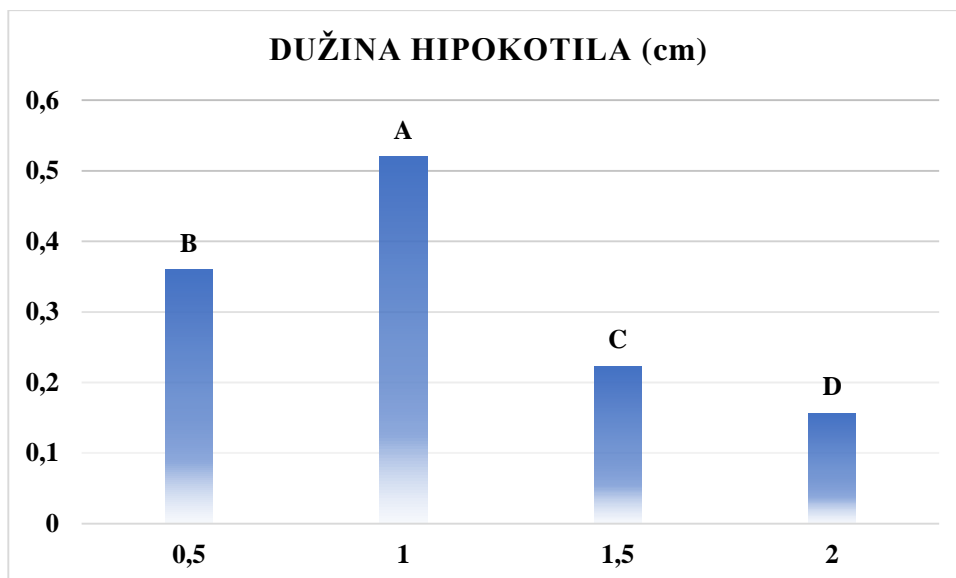
Statističkom obradom podataka nije zabilježena značajna razlika u klijavosti između tretmana s najmanjom koncentracijom regulatora rasta BAP i tretmana s dvije najveće ispitivane koncentracije citokinina u hranjivoj podlozi. Značajno niža vrijednost u odnosu na navedene tretmane zabilježena je kod tretmana s koncentracijom BAP 1 mg/L. Najveći postotak klijavosti zabilježen je na tretmanu s 1,5 mg/L BAP i iznosio je 15 %. Najmanji postotak klijavost iznosio je 5 % (Grafikon 4.).



\*0,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 5. Prosječna dužina korijena (cm) damašćanske crnjike kod *in vitro* uzgoja

Kod ispitivanog parametra dužine korijena zabilježene su statistički značajna razlike između svih ispitivanih tretmana. Najveća prosječna dužina korijena zabilježena je kod tretmana citokinina u koncentraciji 1 mg/L i iznosila je 0,42 cm, dok je najmanja prosječna dužina iznosila 0,12 cm, a zabilježena je na tretmanu citokinina u koncentraciji 1,5 mg/L (Grafikon 5.).



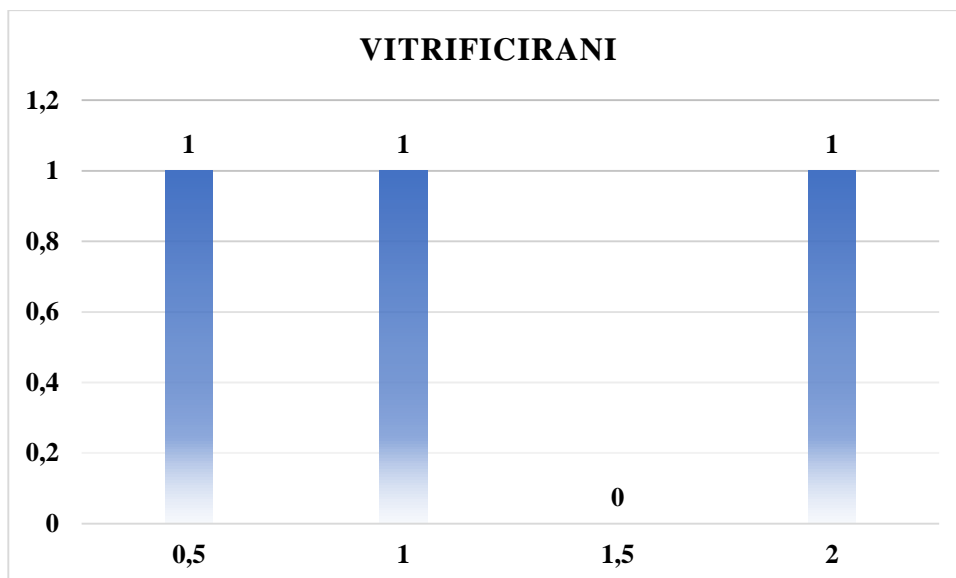
\*0,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 6. Prosječna dužina hipokotila (cm) damašćanske crnjike kod *in vitro* uzgoja

Isto, kod ispitivanog parametra dužine hipokotila (cm) zabilježen je značajni utjecaj tretmana regulatorom rasta BAP između svih ispitivanih tretmana. Najveća vrijednost zabilježena je kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1 mg/L, a iznosio je 0,52 cm. Najmanja prosječna dužina hipokotila iznosila je 0,15 cm i zabilježena je kod tretmana s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L (Grafikon 6.).

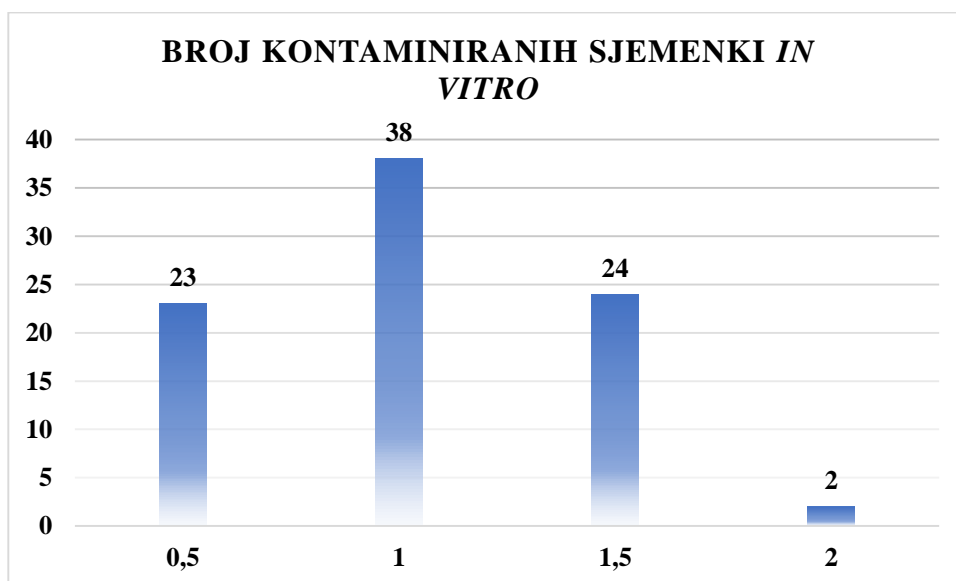
Dobiveni rezultati pokazuju kako je kod tretmana BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L, 1 mg/L i 2 mg/L zabilježen jedan vitrificirani klijanac, dok kod tretmana citokininom u koncentraciji 1,5 mg/L nije zabilježen niti jedan vitrificirani klijanac (Grafikon 7.).

Najveći broj kontaminiranih sjemenki iznosio je 38 i zabilježen je kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1 mg/L. Kod tretmana BAP-om u koncentraciji 2 mg/L zabilježeno je najmanje kontaminiranih sjemenki odnosno 2. Kod preostala dva tretmana zabilježen je približno jednak broj kontaminiranog sjemena, kod tretmana BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L 23 sjemenki, a kod tretmana u koncentraciji 1,5 mg/L 24 sjemenki (Grafikon 8.).



\*0,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 7. Prosječan broj vitrificiranih sjemenki damašćanske crnjike kod *in vitro* uzgoja



\*0,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L; 1 - hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L; 1,5 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L; 2 – hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L. Stupci označeni različitim slovima statistički značajno se razlikuju.

Grafikon 8. Prosječan broj kontaminiranog sjemena damašćanske crnjike kod *in vitro* uzgoja

## 5. RASPRAVA

Visoko kvalitetno sjeme i biljni materijal izuzetno su važni za komercijalno cvjećarstvo (Horvat i sur., 2013.).

Hormoni koji reguliraju klijanje su giberelini, auksini, citokinini i ABA kao endogeni inhibitor. Brojne komponente mogu imati stimulativan učinak na rast biljaka, no najpoznatiji stimulatori rasta su biljni hormoni auksini, citokinini te giberelini (Teklić, 2012.).

U ovom istraživanju ispitana je klijavost damaščanske crnjike (*Nigella damascena* L.) na filter papiru i *in vitro* hranjivoj podlozi pod utjecajem različitih koncentracija regulatora rasta citokinina. Tretmani su obilježeni sljedećim oznakama K (netretirano sjeme); 0,5 (sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L); 1 (sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1 mg/L); 1,5 (sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L); 2 (sjeme tretirano BAP-om u koncentraciji 2 mg/L).

### 5.1. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damaščanske crnjike na filter papiru

Rezultati istraživanja su pokazali kako se postotka klijavosti razlikuje pod utjecajem različitih koncentracija hormona. Iako je zabilježena veća klijavost kod svih ispitivanih tretmana u odnosu na kontrolni tretman, jedino se tretman 1 značajno razlikovao u odnosu na kontrolu i ostale ispitivane tretmane. Zabilježeni postotak klijavosti na tom tretmanu iznosio je 65 %, dok je prosječna klijavost svih tretmana iznosila 49 %. Sjeme je kupljeno u trgovačkom centru, a proizvođač navodi rok trajanja do 12. mjeseca 2020. godine. Podatak o klijavosti sjemena na samoj vrećici nije dostupan, a u Republici Hrvatskoj zakonski nije niti obavezan. Horvat (2012.) navodi kako su rezultati ispitivanja klijavosti sjemena cvjetnih vrsta kupljenih nasumično u maloprodaji među kojima se našla i *Nigella damascena* L. pokazali kako sve cvjetne vrste koje su ispitane imaju lošu klijavost ili uopće nisu klijave. Nadalje, ispitivanje jednogodišnjih cvjetnih vrsta u istraživanju Horvat i sur. (2017.) pokazalo je kako je klijavost većine ispitivanih tradicionalnih cvjetnih vrsta bilo ispod 50 %, a kod nekih uzoraka klijavost je bila 0 %. Problem je što se kontrola kvalitete sjemena na tržištu provodi u vidu inspeksijskog nadzora nad sjemenom svih biljnih vrsta osim cvijeća. U ispitivanju kvalitete sjemena cvjetnih vrsta koje se tradicionalno koriste u suhim cvjetnim aranžmanima, dostupnim na hrvatskom tržištu 2011. godine proučavano je 19 uzoraka

sjemena među kojima je bila i *Nigella damascena* L. Najsiromašnija značajka ispitivanja bila je klijavost u rasponu od 0 do 94 % te je zaključak ovog istraživanja kako bi se hrvatsko tržište cvijeća trebalo opskrbljivati kvalitetnijim sjemenkama (Horvat i sur., 2012.).

U ovom istraživanju možemo vidjeti pozitivan učinak tretmana regulatorom rasta citokininom na povećanje klijavosti pri svim istraživanim koncentracijama, a najveći učinak pri koncentraciji 1 mg/L. Ispitivanjem utjecaja hormona na klijavost sjemena rajčice prethodno natopljene u različite koncentracije citokinina (BAP i Kin) Nawaz i sur. (2012.) zaključili su kako citokinin u različitim koncentracijama BAP-a i kinetina poboljšava potencijal klijanja.

Različite koncentracije regulatora rasta BAP značajno su utjecale na dužinu korijena i hipokotila klijanaca damašćanske crnjike. U odnosu na kontrolni tretman zabilježene su značajno niže vrijednosti dužine korijena kod tretmana 0,5, 1,5 i 2. Kod dužine hipokotila zabilježene su značajno niže vrijednosti svih ispitivanih tretmana u odnosu na tretman 1,5, a u odnosu na kontrolni tretman tretmani 0,5, 1 i 2. S obzirom da su zabilježene 78 % niže vrijednosti dužine korijena i 36 % niže vrijednosti hipokotila na tretmanu 2 u odnosu na kontrolni tretman možemo govoriti i o inhibitornom učinku citokinina pri koncentraciji od 2 mg/L. Slično, u istraživanju Kumaran i sur. (1992.) koji su istraživali utjecaj regulatora rasta na klijavost i rast sjemena *Azadirachta indica* zabilježili su veću dužinu korijena na tretmanu kinetinom s nižom koncentracijom od 200 ppm na sjemenkama natopljenim na 48 sati. Sjemenke su prethodno natopljene u otopinu s 200 ppm i 400 ppm kinetina na 24 i 48 sati. Rezultati su pokazali kako je klijavost povećana kinetinom, a najveća klijavost od 96 % postignuta je tretmanom kinetinom s 200 ppm sa sjemenkama natopljenim na 24 sata. Iz ovog istraživanja može se zaključiti kako je klijanje poboljšano kinetinom pri nižim koncentracijama.

Khan i Rizvi (1993.) istraživanjem utjecaja regulatora rasta kinetina na klijanje i rani rast *Atriplex griffithii* var. *stocksii* na filter papiru zaključili su kako kinetin dobro utječe na klijavost, raniji rast i dužinu korijena te hipokotila. U istraživanju su ispitivani tretmani kinetinom s 0,46, 4,60 te 46 µM. Dobiveni rezultati pokazali su da je najveća dužina korijena postignuta tretmanom kinetinom s 0,46 µM. Najveća dužina hipokotila postignuta je tretmanom kinetinom s 46 µM. Small i sur. (2019.) provodili su ispitivanje klijavosti na filter papiru kako bi utvrdili učinke regulatora rasta biljaka na 9 autohtonih trava i izvornih vrsta sa područja Alberta. Biljke su prethodno natopljene u otopini s 5 mg/L citokinina (kinetina)

na 24 sata. Rezultati srednje klijavosti su samo kod jedne biljke pokazali nižu klijavost od 65 %, dok je kod ostalih bilo od 82 do 92 %. Za većinu testiranih biljaka kinetin je imao značajan utjecaj u povećanju razvoja korijena.

Suo i sur. (2017.) procjenjivali su potencijalnu učinkovitost regulatora rasta biljaka u poboljšanju klijavosti sjemena i jačanju sadnica. Kao sredstvo za oblaganje sjemena korišten je 6-benzilaminopurin (BAP) u koncentracijama od 20, 40, 60, 80 i 100 mg/L. Rezultati su pokazali kako je BAP u koncentracijama od 20 i 40 mg/L posebno poboljšao vitalnost i klijavost sjemena. Različite koncentracije BAP-a značajno su inhibirale dužine korijena, a najveća dužina postignuta je tretmanom BAP-a s 20 mg/L. Zaključak istraživanja bio je da je premaz sjemena BAP-om u koncentraciji 20 i 40 mg/L bio koristan za brzu, ujednačenu klijavost i pojavu sadnica u slatkom kukuruzu.

Rami i Patel (2014.) istraživali su učinak regulatora rasta na klijavost sjemena, duljinu izdanka, duljinu korijena, težinu svježe i suhe tvari na MS hranjivoj podlozi kod *Oroxylum indicum* L. Sjemenke su bile prethodno natopljene u otopine različitih hormona kao što su GA3, BAP, Kin te zeatin kako bi se procijenio njihov učinak na klijanje. Kod tretmana s BAP-om uočena je klijavost sjemena od 0 %. Rezultati su pokazali kako GA3 na 50 ppm ima značajan učinak na klijanje.

## **5.2. Utjecaj regulatora rasta citokinina na klijavost damašćanske crnjike *in vitro***

Tretmani kod ispitivanja klijavosti sjemena damašćanske crnjike *in vitro* obilježeni su sljedećim oznakama 0,5 (hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 0,5 mg/L); 1 (hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1 mg/L); 1,5 (hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L); 2 (hranjiva podloga s BAP-om u koncentraciji 2 mg/L).

Rezultati klijanja damašćanske crnjike u *in vitro* uvjetima uzgoja pokazali su vrlo mali postotak klijavosti. Najveći postotak od 15 % dobiven je na hranjivoj podlozi s koncentracijom 1,5 mg/L BAP-a. Izmjerene dužine korijena i hipokotila pokazale su da tretman BAP-om u koncentraciji 1 mg/L ima najveći utjecaj, odnosno na tom tretmanu su zabilježene najveće vrijednosti navedenih parametara.

Pati i sur. (2012.) istraživali su održivost sjemena *Digitalis purpurea* L. i utjecaj regulatora rasta na klijavost i razvoj sjemena *in vitro* na MS hranjivoj podlozi koja je sadržavala različite koncentracije citokinina (BAP, Kin i TDZ) i auksina (NAA, IAA i 2,4-D) same i u

kombinaciji. Rezultat je pokazao kako dodavanje citokinina i auksina u medij značajno povećava klijavost.

Hossain i sur. (2013.) provodili su istraživanje na *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C. Fisch vezano za klijavost sjemeni, mikropropagaciju i cvjetanje u *in vitro* uvjetima. Istraživanje je provedeno na različitim medijima (MS, PM, M i KC) te s različitim regulatorima rasta (BAP, 2,4-D, pepton i aktivni ugljen). Tretmani s peptonom i BAP-om rezultirali su povećanom postotku klijavosti.

Proučavanjem utjecaja citokinina (zeatina (ZEA), izopentenil adenina (2iP), kinetina (KIN), benziladenina (BAP) te tidiazurona (TDZ)) na klijavost sjemeni, produljenje izdanka i korijena sadnica *Lotus corniculatus* L. uzgojenih na MS hranjivoj podlozi Nikolić i sur. (2006.) zaključili su kako su svi citokinini stimulirali brzi i velik postotak klijavosti sjemeni. Najaktivniji su bili TDZ i ZEA, a slijedio ih je BA, dok su KIN i 2iP stimulirali klijavost samo u višim koncentracijama. Produženje izbojaka i korijena snažno je inhibiralo pri nižim koncentracijama TDZ i BAP, dok su ZEA, KIN i 2iP pokazali umjerenu inhibiciju.

Vitrifikacija biljaka *in vitro* pojava je koja utječe na pravilan razvoj biljaka u kulturi tkiva. Pogođene biljke pokazuju hiperhidriranost tkiva i hipertrofiju, nedostatak klorofila a i b, nedostatak lignifikacije stanične stijenke ili samo sloja koji okružuje staničnu membranu, listovi imaju velike međustanične prostore u spužvastim mezofilnim i palisadnim stanicama (Pasqualetto, 1990.). Broj vitrificiranih klijanaca damaščanske crnjike na svim tretmanima iznosio je 3.

Hranjiva podloga koja se koristi za uzgoj biljnog tkiva dobar je izvor energije koji podržava i rast mikroorganizama. Ovi mikroorganizmi se natječu za iskorištenje hranjivih tvari prisutnih u kulturi biljnog tkiva. Prisutnost mikroorganizama u kulturama biljnih stanica dovodi do povećane smrtnosti stanica u kulturi, prisutnost latentnih infekcija, a može rezultirati i promjenjivim rastom, nekrozom tkiva, smanjenom proliferacijom izdanaka i smanjenim razvojem korijena (Varghese i Joy, 2016). U ovom istraživanju, broj kontaminiranih sjemenki kretao se od 38 sjemenki zabilježenih na tretmanu 1 do 2 sjemenke zabilježene na tretmanu 2.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Općenito tretman regulatorom rasta citokinin u svim koncentracijama je pozitivno utjecao na povećanje klijavosti na filter papiru u odnosu na kontrolni tretman. Najveća zabilježena vrijednost klijavosti i ujedno jedina značajno veća vrijednost od kontrole zabilježena je kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1 mg/L i iznosila je 65 %. Prosjek svih tretmana od 49 % upućuje na slabu klijavost sjemena.
2. Dužina korijena je varirala među tretmanima, a ističe se najmanja vrijednost ovog parametra zabilježena kod tretmana BAP-om u koncentraciji 2 mg/L gdje je zabilježena 78 % niža vrijednost u odnosu na kontrolu.
3. Također, i kod ispitivanog parametra dužine hipokotila zabilježen je značajan utjecaj različitih koncentracija regulatora rasta. Najveća vrijednost zabilježena je kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L i iznosila je 1,52 cm, a najmanja kod tretmana BAP-om u koncentraciji 2 mg/L i iznosila je 0,93 cm.
4. Inhibitorno djelovanje citokinina pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 2 mg/L BAP očituje se kroz 78 % niže vrijednosti dužine korijena i 36 % niže vrijednosti hipokotila u odnosu na kontrolni tretman.
5. Ispitivanje klijavosti u uvjetima *in vitro* pokazalo se neuspješno budući da je najveća zabilježena klijavost iznosila 15 % i zabilježena je na tretmanu BAP-om u koncentraciji 1,5 mg/L.
6. Najveća dužina korijena i hipokotila u *in vitro* uvjetima zabilježene su kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1 mg/L, a najniže kod tretmana BAP-om u koncentraciji 1,5 i 2 mg/L.
7. Rezultati istraživanja upućuju na općenito slabu klijavost sjemena cvjetne vrste damašćanske crnjike na filter papiru, a posebno u uvjetima *in vitro*. Pretpostavka je kako potrebna dodatna priprema sjemena kao eksplantata za uvođenje u kulturu tkiva te postizanje boljeg razvoja klijanaca.



## 7. POPIS LITERATURE

- Al-Ani, N. K. (2008.): Thymol Production from Callus Culture of *Nigella sativa* L. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 18(2), pp. 181-185. doi: 10.3329/ptcb.v18i2.3649.
- Altman, A. (2000.): Micropropagation of plants, principles and practice. Spier, R. E. Encyclopedia of Cell Technology. New York: John Wiley & Sons, 916-929.
- Altman, A., Loberant, B. (1998.) Micropropagation. In: Altman A., editor. Agricultural biotechnology. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. pp. 19–48.
- Brickell, C. (2006.): Encyclopedia of plants and flowers. The Royal Horticultural Society, London.
- Debergh, P., Zimmerman, R. H. (1990.): Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic; p. 484.
- Deroin, T., Damerval, C., Le Gulloux, M., Jabbour, F. (2015.): Floral vascular patterns of the double-flowered and wild type morphs of *Nigella damascena* L. (*Ranunculaceae*). Modern Phytomorphology, 7, 13-20.
- El-Ghamery, A. A., Mousa, M. A. (2017.): Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radicle growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L. Annals of Agricultural Sciences, Volume 62, Issue 1, June 2017, Pages 11-21.
- Goncalves, B. (2013.): A floral dimorphism in *Nigella damascena* L.: genetic and molecular control, and adaptive significance. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, English.
- Gubiš, J., Lajchova, Z., Farago, J., Jurekova, Z. (2004.): Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Biologia, Bratislava, 59/3, 405-408.
- Heiss, A. G., Oegg, K. (2005.): The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (*Ranunculaceae*) and its possible introduction to central Europe. Vegetation History and Archaeobotany, 14, 562-570.
- Heiss, A. G., Kropf, M., Sontag, S., Weber, A. (2011.): Seed morphology of *Nigella s. L.* (*Ranunculaceae*): identification, diagnostic traits, and their potential phylogenetic relevance. International Journal of Plant Sciences, 172 (2): 267-284.

Hegi, G. (1975.): Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Volume III/3, 2<sup>nd</sup> edn., Parey, Berlin.

Horvat, D. (2012.): Klijavost sjemena cvjetnih vrsta na tržištu Hrvatske. Glasnik zaštite bilja, 3/2012, 10-17.

Horvat, D., Erhatic, R., Husinec, R., Židovec, V. (2012.): Seed quality evaluation of flower species used in dried floral arrangements. Acta Hortic, 970, 347-353 DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.970.42. Međunarodna konferencija o upravljanju kvalitetom u lancima opskrbe ukrasnim biljem, Zbornik sažetaka / Sirichai Kanlayanarat & Mantana Buanong - Bangkok: Tehnološko sveučilište kralja Mongkuta Thonburi, 21.-24. veljače 2012., 33-33

Horvat D. (2017.): Ukasna vrijednost, urod i kakvoća sjemena vrsta *Nigella damascena* L. i *Nigella sativa* L. u različitim uvjetima uzgoja. Doktorski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu.

Horvat, D., Židovec, V., Marcijuš, S. (2017.): Kvaliteta sjemena tradicionalnih cvjetnih vrsta za amaterski uzgoj. Izlaganje na znanstvenom skupu: Peti međunarodni znanstveno stručni skup Hrvatsko oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo i Europske integracije, 26.-28. rujan 2012., UDK: 635.153 (045) = 862. Sjemenarstvo, Volumen 30, 1-2, 65-76

Hossain, M. M., Sharma, M., Pathak, P. (2013.): *In vitro* propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) - seed germination to flowering. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, Volume 22, Issue 2, 157-167.

Khan, M. A., Rizvi, Y. (1993.): Effect of salinity, temperature, and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. Canadian Journal of Botany, 72(4), 475-479.

Kököl, G., İlçim, A., Özbilgin, B., Uygun, C. (2006.): Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella* in Turkey. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara, 35(1), 19-41.

Kolb, Y., Konechna, R., Yaremkenich, O., Milyanich, A., Novikov, V. (2019.): *Nigella damascena* as an object of biotechnological research. 2<sup>nd</sup> international scientific conference "Chemical technology and engineering", 24-28.6.2019. Lviv, Ukraine. ISSN: 2664-1275.

Kumar, N., Reddy, M. (2011.): *In vitro* Plant Propagation: A Review. Journal of Forest and Environmental Science, 27., 61-72.

- Kumaran, K., Palani, M., Jerlin, R., Surendran, C. (1992.): Effects of growth regulators on seed germination and seedling growth of neem (*Azadirachta indica*). Jurnal od Tropical Forest Science, 6(4), 529-532.
- Loberant, B., Altman, A. (2010): Micropropagation of plants. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, edited by Michael C. Flickinger; 2010 John Wiley & Sons, Inc., 1-17.
- Mawahib, E. M. Elnuor, Futooh, Z. A. Mahmood, Yagoub, Sanaa O. (2015.): *In Vitro* Callus Induction and Antimicrobial Activities of Callus and Seeds Extracts of *Nigella Sativa* L. Research & Reviews: Journal of Biology, Volumen 3, Issue 3, July-September, 2015., e-ISSN:2322-0066, 21-28.
- Nabeel K. Al-Ani (2008.): Thymol Production from Callus Culture of *Nigella sativa* L. Plant Tissue Cult. & Biotech, 18(2): 181-185, 2008 (December).
- Nawaz, A., Amjad, M., Khau, S. M., Ahmed, T., Iqbal, Q., Iqbal, J. (2012.): Tomato seed invigoration with cytokinins. The Journal of Animal and Plant Sciences, 22(4): 2012., 121-128, ISSN: 1018-7081.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R., Nešković, M. (2006.): Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. Journal of Plant Growth Regulation, 25, 187-194.
- Pasqualetto, P. L. (1990.): Vitrification in Plant Tissue Culture. In: Rodríguez R., Tamés R.S., Durzan D.J. (eds) Plant Aging. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 186. Springer, Boston, MA
- Pati, J. G., Ahire, M. L., Nikam, T. D. (2012.): Influence of plant growth regulators on *in vitro* seed germination and seedling development of *Digitalis purpurea* L. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 6, 12-18.
- Pavlović, M. (2016.): Utjecaj različitog osvjetljenja na klijavost damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.) i različka (*Centaurea cyanus* L.). Završni rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
- Raman, K., Greyson, R. I. (1978.): Further observations on the differential sensitivities to plant growth regulators by cultured „single“ and „double“ flower buds of *Nigella damascena* L. (*Ranunculaceae*). American Journal of Borany, Volume 65, Issue 2, 180-191.

Rami, E., Patel, I. (2014.): Effect of plant growth regulators on seed germination and seedling vigour index of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. : an endangered medicinal plant. Plant Archives, Volume 14, No. 1, 579-582.

Rouhi, H. R. , Sepehri, A., Karimi, F. (2012.): Study of dormancy-breaking of Black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). Annals of Biological Research 2012., Volume 3 No.:6 pp.2651-2655 ref.17.

Rudnicki, R. M., Kaukovirta, E. (1991.): The influence of seed uniformity ga and red light on germination and seedling emergence of *Nigella damascena* L. Seed Science & Technology, 19(3): 597-603.

Small, C. C., Degenhardt, D., McDonald, T. (2019.): Plant growth regulators for enhancing Alberta native grass and forb seed germination. Ecological Engineering: X, Volume 1, June 2019., 100003.

Suo, H. C., Li, W., Wang, K. H., Ashraf, U., Liu, J. H., Hu, J. G., Li, Z. J., Zhang, X. L., Xie, J., Zheng, J. R. (2017.): Plant growth regulators in seed coating agent affect seed germination and seedling growth of sweet corn. Applied ecology and environmental research, 15(4), 829-839.

Teklić, T. (2012.): Fiziologija bilja u povrćarstvu i cvjećarstvu. Internetska skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek, 2012.

Tkalec, M., Blažević, M., Babac, D., Pavlović, M., Kraljićak, J., Zeljković, S., Vinković, T., Parađiković, N. (2017.): Klijavost sjemena cvjetnih vrsta pod utjecajem LED osvjetljenja. Izvorni znanstveni rad. Zbornik radova 52. hrvatskog i 12. međunarodnog simpozija agronoma. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 315-319.

Varghese, N., Joy, P. P. (2016.): Plant tissue culture contaminants identification and its response to fumigation. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/306034945\\_Plant\\_tissue\\_culture\\_contaminants\\_i](https://www.researchgate.net/publication/306034945_Plant_tissue_culture_contaminants_identification_and_its_response_to_fumigation)  
[dentification\\_and\\_its\\_response\\_to\\_fumigation](https://www.researchgate.net/publication/306034945_Plant_tissue_culture_contaminants_identification_and_its_response_to_fumigation)

Zobayed, S. M. A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C., Kozai, T. (2000.): Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. Annals of Botany, Volume 85, Issue 5, 587-592.

Zohary M. (1983.): The genus *Nigella* (*Ranunculaceae*): a taxonomic revision. Plant Systematics and Evolution, Volume 142, Issue 1-2, 71-105.

*Nigella* (<https://en.wikipedia.org/wiki/Nigella> ). Datum pristupa: 14. lipnja 2019.

*Nigella damascena* L. ([https://en.wikipedia.org/wiki/Nigella\\_damascena#cite\\_note-RHSLG-4](https://en.wikipedia.org/wiki/Nigella_damascena#cite_note-RHSLG-4) ). Datum pristupa: 14. lipnja 2019.

Damašćanska crnjika. 21. siječnja 2015. (<https://www.plantea.com.hr/damascanska-crnjika/> ). Datum pristupa: 14. lipnja 2019.

## 8. SAŽETAK

Istraživanje je provedeno 2019. godine na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Pokus je postavljen u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito i začinsko bilje. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija regulatora rasta na klijavost damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.) na filter papiru i *in vitro* hranjivoj podlozi. Pokus se sastojao od 15 petrijevih zdjelica s 300 sjemenki kod postupka uzgoja na filter papiru i 12 petrijevih zdjelica s 240 sjemenki kod postupka uzgoja *in vitro*. Kod postupka uzgoja na filter papiru bilo je pet tretmana sa po tri ponavljanja gdje je sjeme damašćanske crnjike prethodno natopljeno u otopine s različitim koncentracijama citokinina (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L) u kojoj su stajale 24 h. Kod postupka uzgoja *in vitro* bilo je četiri tretmana sa po tri ponavljanja u kojemu su korištene podloge s različitim koncentracijama citokinina u količini od 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L. Nakon 14 dana u oba postupka zabilježen je broj proklijalih sjemenki, dužina korijena (cm), dužina hipokotila (cm), te kod *in vitro* uzgoja broj nitrificiranih i kontaminiranih klijanaca. Rezultati istraživanja kod uzgoja na filter papiru pokazali su kako se postotka klijavosti razlikuje pod utjecajem različitih koncentracija hormona. Iako je zabilježena veća klijavost kod svih ispitivanih tretmana u odnosu na kontrolni tretman, jedino se tretman u koncentraciji od 1 mg/L značajno razlikovao u odnosu na kontrolu i ostale ispitivane tretmane. Zabilježeni postotak klijavosti na tom tretmanu iznosio je 65 %, dok je prosječna klijavost svih tretmana iznosila 49 %. Rezultati klijanja damašćanske crnjike u *in vitro* uvjetima uzgoja pokazali su vrlo mali postotak klijavosti. Najveći postotak od 15 % dobiven je na hranjivoj podlozi s koncentracijom 1,5 mg/L BAP-a. Izmjerene dužine korijena i hipokotila pokazale su da tretman BAP-om u koncentraciji 1 mg/L ima najveći utjecaj, odnosno na tom tretmanu su zabilježene najveće vrijednosti navedenih parametara.

Ključne riječi: *Nigella damascena* L., mikropropagacija, uzgoj na filter papiru, hormoni, regulatori rasta, klijavost

## 9. SUMMARY

The research was conducted 2019 year in Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. The experiment was set up in Laboratory for vegetable, floriculture, herbs, and spices. The focus of this research was to examine the influence of different concentrations of growth regulators on the germination of the ragged lady (*Nigella damascena* L.) on a paper filter and *in vitro* nutrient base. The experiment consisted of 15 petri dishes with 300 seeds with paper filters cultivation and 12 petri dishes with 240 seeds with *in vitro* cultivation. There were five treatments with paper filter cultivation with three repeats where ragged lady seeds were soaked in different concentrations cytokinins (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L) where they stayed for 24 hours. There were four treatments with *in vitro* cultivation with three repeats where different pad with different concentration of cytokinins 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L was used. After 14 days it was recorded in both procedures number of germinated seeds, root length (cm), hypocotyls length (cm), and in *in vitro* procedure number of nitrified and contaminated seedlings. Research results with paper filters showed a different percentage of germinated seeds with different concentrations of hormones. Although there was a higher percentage of germinated seeds in controlled treatment, only treatment with 1 mg/L differed significantly in contrast to controlled and other experimented procedures. Recorded germinated seeds in that treatment was 65 %, while in other procedures that percentage was 45 %. The fertility results of ragged lady in *in vitro* cultivation conditions showed a very small percentage of germination. The highest percentage of 15 % was obtained in a nutrient medium with a concentration of 1,5 mg/L BAP. Measured root and hypocotyl lengths showed that BAP treatment at 1 mg /L has the greatest influence, ie the highest values of the above parameters have been recorded in this treatment.

Keywords: *Nigella damascena* L., micropropagation, cultivation on the paper filter, hormones, growth regulators, germination

## **10. POPIS TABLICA**

Tablica 1. Klasifikacija damaščanske crnjike (*Nigella damascena* L.).....3

Tablica 2. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge.....16



## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Damaščanska crnjika ( <i>Nigella damascena</i> L.).....	2
Slika 2. Cvijet damaščanske crnjike ( <i>Nigella damascene</i> L.).....	4
Slika 3. Tobolac damaščanske crnjike ( <i>Nigella damascene</i> L.) .....	4
Slika 4. Sjeme damaščanske crnjike .....	13
Slika 5. Petrijeve zdjelice .....	14
Slika 6. Sjemenke natopljene u različitim koncentracijama citokinina .....	14
Slika 7. Hranjive podloge s različitom koncentracijom citokinina BAP .....	16
Slika 8. Eksplantati u klima komori .....	17

## 12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Postotak klijavosti damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru.....	18
Grafikon 2. Prosječna dužina korijena (cm) damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru.....	19
Grafikon 3. Prosječna dužina hipokotila (cm) damašćanske crnjike kod uzgoja na filter papiru.....	20
Grafikon 4. Postotak klijavosti (%) damašćanske crnjike kod <i>in vitro</i> uzgoja.....	20
Grafikon 5. Prosječna dužina korijena (cm) damašćanske crnjike kod <i>in vitro</i> uzgoja.....	21
Grafikon 6. Prosječna dužina hipokotila (cm) damašćanske crnjike kod <i>in vitro</i> uzgoja....	22
Grafikon 7. Prosječan broj nitrificiranih sjemenki damašćanske crnjike kod <i>in vitro</i> uzgoja.....	23
Grafikon 8. Prosječan broj kontaminiranog sjemena damašćanske crnjike kod <i>in vitro</i> uzgoja.....	23

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Povrćarstvo i cvjećarstvo

Diplomski rad

Utjecaj regulatora rasta u klijavost damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.)

Iva Kovačević

Sažetak: Istraživanje je provedeno 2019. godine na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Pokus je postavljen u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito i začinsko bilje. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija regulatora rasta na klijavost damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.) na filter papiru i *in vitro* hranjivoj podlozi. Pokus se sastojao od 15 petrijevih zdjelica s 300 sjemenki kod postupka uzgoja na filter papiru i 12 petrijevih zdjelica s 240 sjemenki kod postupka uzgoja *in vitro*. Kod postupka uzgoja na filter papiru bilo je pet tretmana sa po tri ponavljanja gdje je sjeme damašćanske crnjike prethodno natopljeno u otopine s različitim koncentracijama citokinina (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L) u kojoj su stajale 24 h. Kod postupka uzgoja *in vitro* bilo je četiri tretmana sa po tri ponavljanja u kojemu su korištene podloge s različitim koncentracijama citokinina u količini od 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L. Nakon 14 dana u oba postupka zabilježen je broj proklijalih sjemenki, dužina korijena (cm), dužina hipokotila (cm), te kod *in vitro* uzgoja broj nitrificiranih i kontaminiranih klijanaca. Rezultati istraživanja kod uzgoja na filter papiru pokazali su kako se postotka klijavosti razlikuje pod utjecajem različitih koncentracija hormona. Iako je zabilježena veća klijavost kod svih ispitivanih tretmana u odnosu na kontrolni tretman, jedino se tretman u koncentraciji od 1 mg/L značajno razlikovao u odnosu na kontrolu i ostale ispitivane tretmane. Zabilježeni postotak klijavosti na tom tretmanu iznosio je 65 %, dok je prosječna klijavost svih tretmana iznosila 49 %. Rezultati klijanja damašćanske crnjike u *in vitro* uvjetima uzgoja pokazali su vrlo mali postotak klijavosti. Najveći postotak od 15 % dobiven je na hranjivoj podlozi s koncentracijom 1,5 mg/L BAP-a. Izmjerene dužine korijena i hipokotila pokazale su da tretman BAP-om u koncentraciji 1 mg/L ima najveći utjecaj, odnosno na tom tretmanu su zabilježene najveće vrijednosti navedenih parametara.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: dr.sc. Monika Tkalec Kojić

Broj stranica: 38

Broj grafikona i slika: 16

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 44

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Nigella damascena* L., mikropropagacija, uzgoj na filter papiru, hormoni, regulatori rasta, klijavost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković, predsjednik

2. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor

3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira

Preloga 9

## Basic documentation card

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek  
University Graduate Studies, Vegetable and flower growing

Graduate thesis

### Influence of growth regulators on *Nigella damascena* L. germination Iva Kovačević

**Abstract:** The research was conducted 2019 year in Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. The experiment was set up in Laboratory for vegetable, floriculture, herbs, and spices. The focus of this research was to examine the influence of different concentrations of growth regulators on the germination of the ragged lady (*Nigella damascena* L.) on a paper filter and *in vitro* nutrient base. The experiment consisted of 15 petri dishes with 300 seeds with paper filters cultivation and 12 petri dishes with 240 seeds with *in vitro* cultivation. There were five treatments with paper filter cultivation with three repeats where ragged lady seeds were soaked in different concentrations cytokinins (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L) where they stayed for 24 hours. There were four treatments with *in vitro* cultivation with three repeats where different pad with different concentration of cytokinins 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L was used. After 14 days it was recorded in both procedures number of germinated seeds, root length (cm), hypocotyls length (cm), and in *in vitro* procedure number of nitrified and contaminated seedlings. Research results with paper filters showed a different percentage of germinated seeds with different concentrations of hormones. Although there was a higher percentage of germinated seeds in controlled treatment, only treatment with 1 mg/L differed significantly in contrast to controlled and other experimented procedures. Recorded germinated seeds in that treatment was 65 %, while in other procedures that percentage was 45 %. The fertility results of ragged lady in *in vitro* cultivation conditions showed a very small percentage of germination. The highest percentage of 15 % was obtained in a nutrient medium with a concentration of 1,5 mg/L BAP. Measured root and hypocotyl lengths showed that BAP treatment at 1 mg /L has the greatest influence, ie the highest values of the above parameters have been recorded in this treatment.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: dr.sc. Monika Tkalec Kojić

Number of pages: 38

Number of figures: 16

Number of tables: 2

Number of references: 44

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: *Nigella damascena* L., micropropagation, cultivation on the paper filter, hormones, growth regulators, germination

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković, chairman

2. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor

3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1